

转基因拟南芥中雌激素诱导的转录激活系统诱导条件的优化

胡晓龙^{1,2}, 徐妙云², 王磊²

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 [目的]探索雌激素诱导的转录激活系统(XVE)在拟南芥中高效表达外源蛋白的条件。[方法]构建 XVE-AtNF-YA10;3×flag 植物表达载体,转化拟南芥并获得了阳性植株;采用3种不同的诱导表达条件对外源蛋白的表达量进行检测。[结果]1/2MS培养基生长10 d后的拟南芥转基因苗外源融合蛋白表达量最高,进一步研究表明1/2MS培养基生长10 d后的拟南芥转基因苗在受诱导后8、16、24和32 h外源融合蛋白均有表达,在16 h时表达量达到最高,并持续到32 h。[结论]AtNF-YA10;3×flag融合外源基因最优表达条件为1/2MS培养基生长10 d后的拟南芥转基因苗雌激素诱导16 h。

关键词 雌激素;转录激活系统;拟南芥;蛋白表达

中图分类号 S188;Q812 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)11-03175-04

Optimization of Protein Expression Condition of Estrogen-induced Transactivator (XVE) System in Transgenic Arabidopsis

HU Xiao-long et al (College of Life and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010)

Abstract [Objective] To optimize the protein expression using an estrogen-induced transcriptional activation system. [Method] The plasmid XVE-AtNF-YA10;3×flag was constructed and transferred into Arabidopsis, and the positive plants were obtained. Three approaches were used to test the protein expression level. [Results] The data showed that the protein expression level came to a head in ten-day old transgenic Arabidopsis on the 1/2 MS medium, and the protein was induced to express 8 hour later, and reach a peak from 16 hours to 32 hours. [Conclusion] The best condition for AtNF-YA10;3×flag protein expression in Arabidopsis was ten-day old Arabidopsis induced for 16 hours.

Key words Estrogen; Transcriptional activation system; Arabidopsis thaliana; Protein expression

目前已从动物、植物、病毒及微生物中分离到许多适用于植物基因工程的启动子。按照其作用方式和功能可分为3类:组成型启动子、组织特异性启动子和诱导型启动子。组成型启动子驱动基因表达方式不受时间、部位、诱导物质的影响,在所有组织中都启动基因表达,在植物基因工程中得到了大量的研究和应用。如花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子^[1]、水稻肌动蛋白基因(actin1)的启动子^[2]和玉米泛素基因(ubiquitin)的启动子^[3]等都是常用的启动强度很高的组成型启动子。由于不同物种之间有较大差异,不同来源的强启动子在异源系统中不一定都表现出强驱动能力。CaMV)35S启动子在烟草、拟南芥等双子叶植物系中都表现出非常高的启动活性,但是在大麦中则几乎没有启动活性^[4]。另外由于其表达比较随机,常导致外源基因在植物的全部发育时期所有组织中表达,产生大量异源蛋白质或代谢产物在植物体内积累,加重了植物的合成与代谢负担,阻碍了植物的正常生长,甚至导致死亡^[5]。组织特异性启动子调控的基因则只在某些特定的器官或组织部位表达,此类启动子克服了外源基因在受体植物中非特异性的持续、高效表达所造成的浪费,目前得到了广泛的研究与应用^[6-7]。但是如果需要外源基因大量表达时,特定组织部位则因表达量过低又达不到预期效果。诱导性启动子,是指在某些特定的物理或化学信号的刺激下,该种类型的启动子可以大幅度地提高基因的转录水平。与前面2类启动子相比,该类启动子可以快速有效地诱导转录基因的“开、关”,可根据需要诱导基因表达,这样就不会造成植物体内资源的浪费或者在诱导前期过量表达影

响植物的生长发育。诱导型启动子常以诱导信号命名,可分为光诱导表达基因启动子、热诱导表达基因启动子、创伤诱导表达基因启动子、激素诱导表达基因启动子、真菌诱导表达基因启动子等^[8]。

雌激素诱导的转录激活系统(XVE)包含2个控制目的基因表达的转录单元。第1个转录单元是强组成型启动子G10-90控制的融合基因序列。该融合基因序列由细菌抑制子LexA(X)的DNA结合区、VP16(V)反式激活区和人雌激素受体(E)的调节区组成^[9]。第2个转录单元包括八个拷贝的LexA启动子序列、46 35S微型启动子^[10]以及外源目的基因。在没有雌激素存在时,XVE融合蛋白的人雌激素受体(E)的调节区与HSP90等胞内调节蛋白结合,作为单体定位在细胞质中,当有雌激素存在时,XVE融合蛋白的人雌激素受体(E)的调节区结合雌激素,释放HSP90,并二聚化转运到核内,与外源目的基因上游8个拷贝的LexA启动子序列结合,激活目的基因的表达^[11]。利用报告基因GFP的研究表明,该系统经雌激素诱导之后,GFP的表达水平比由CaMV 35S驱动的GFP高8倍^[9]。XVE系统由于其较低的本底表达水平以及高效表达的特性得到了广泛的研究与应用^[12]。但是不同的目的基因诱导表达效率可能不同,获得表达量最大的时间点也可能与GFP有差异。另外以往的研究仅限于对该系统诱导后目的基因转录水平的检测,对其翻译水平的检测鲜有报导。因此对于特定的目的基因在特定的转基因材料里利用该系统表达外源蛋白的最优化诱导条件的探索就显得很有必要。NF-YA是一类结合CCAAT-box的重要转录因子,包括3个亚基,NF-YA、NF-YB和NF-YC^[13]。在拟南芥中已鉴定了10个NF-YA,13个NF-YB和13个NF-YC基因^[14]。NF-Y家族在植物的生长发育及逆境反应中发挥了重要调控作用并受到miR169家族成员的调控^[15-16]。实验

基金项目 国家自然科学基金项目“miR169介导的逆境诱导植物早花的分子调控机制研究”(31270318)。

作者简介 胡晓龙(1986-),男,湖北随州人,硕士,从事植物发育研究。*通讯作者,研究员,博士,从事植物基因沉默研究。

收稿日期 2014-03-10

室一直致力于 miR169/NF-YA 模块调控功能的研究,其中通过染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation assay, CHIP)方法鉴定 NF-YA 调控的下游序列是一个重要环节,能否获得大量表达的 NF-YA 蛋白成为试验成败的关键,同时也为利用此系统表达其他蛋白建立一个技术体系。鉴于此,笔者以 *AtNF-YA10* 为目的基因,构建由雌激素诱导的转录激活系统(XVE)调控其表达的植物表达载体,并转化拟南芥获得转基因植株,对拟南芥的培养方式、雌激素使用浓度、施用方法、不同处理时间点的表达量等因素进行系统摸索,获得一套适合于拟南芥中 *AtNF-YA10* 高效诱导表达的方法,以期为今后其他同类基因的高效诱导表达及调控机制的解析提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。所用的野生型拟南芥为 Col-0 生态型,大肠杆菌宿主菌为 TOP10,农杆菌宿主菌为 GV3101,均为实验室保存。

1.1.2 主要试剂。pER8-flag 载体,由研究室宗娜博士馈赠,在 3 个 flag 序列的 5'端有 xhoI 和 BstBI 酶切位点;pEASY-T1 Cloning Vector,购自北京全式金生物技术有限公司;Taq DNA Polymerase,购自北京泽星生物科技有限公司;限制性内切酶,均购自 NEB 公司,T4 DNA 连接酶,购自 Promega 公司;丽春红、Hygromycin B、PMSF 和 DTT,均购自 Amresco 公司;PVDF 膜,购自 MILLIPORE (Cat. No.:ISEQ00010);雌激素,购自 Sigma 公司(No. E8875,用 DMSO 溶解成 10 mmol/L 母液储存于 -20 °C 备用);Protease Inhibitor Cocktail Tablets,购自 Roche 公司(No. 04693132001);Monoclonal ANTI-FLAG 抗体,购自 Sigma 公司(No. F1804);荧光二抗 Goat anti-Mouse IR Dye,购自 ODYSSEY 公司(No. C21024-01);胶回收试剂盒,购自 Axygen 公司;引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。测序由北京博艾永华生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *AtNF-YA10*flag 融合基因诱导表达载体的构建。根据拟南芥 *AtNF-YA10* 基因的 cDNA 序列,设计引物 YA10flagFW:5'-CTCGAGATGCAAAGTGGAGC-3' 和 YA10-flagRV:5'-TTCGGATATATTAAGTTTGCAGC AGCC-3',下划线序列分别为 xhoI 和 BstBI 酶切位点。以 cDNA 作为模板,进行 *AtNF-YA10* 基因 CDS 全长扩增。PCR 产物亚克隆至 pEASY-T1 载体,鉴定正确之后的质粒经 xhoI 和 BstBI 双酶切,与经同样双酶切的 pER8-flag 载体连接,获得植物表达载体 pER8-*AtNF-10*flag,表达载体转化至宿主菌 TOP10,菌落 PCR 法筛选出含有目的基因的重组子提取质粒。质粒经 xhoI 和 BstBI 双酶切鉴定,挑选酶切鉴定正确的质粒送测序。挑选测序正确的质粒经电击法转至 GV3101 农杆菌感受态细胞,用 PCR 的方法来筛选阳性重组子。

1.2.2 转基因拟南芥株系的获得。运用蘸花法转化拟南芥^[17],收取 T0 代种子,并用 25 mg/L Hygromycin B 进行抗性筛选。具有抗性的转化苗再经 PCR 鉴定,获得至少 3 个独立

转化的株系。收获 T1 代种子再经 2 次筛选获得 T3 代纯系,用于后续试验研究。

1.2.3 拟南芥植株的培养。①土培法。营养土与蛭石 1:1 混匀后将拟南芥幼苗移栽到土中,14 h 光照/10 h 黑暗,24 °C/22 °C(白天/夜间)培养,光照强度 250 mEinsteins/m²·s。②水培法。将拟南芥幼苗用 Hoagland's 营养液^[18]水培,培养条件同上。③1/2MS 培养基培养。将拟南芥种子用 70% 乙醇+0.05% Triton X-100 溶液浸泡振荡 10 min 后倒掉液体,再用 95% 乙醇清洗 3 次后用无水乙醇清洗 1 次,种子晾干后均匀播撒到 1/2MS 培养基上。置于 24 h 光照,24 °C 条件下培养,光照强度 250 mEinsteins/m²·s。

1.2.4 雌激素诱导转基因拟南芥表达外源 *AtNF-YA10*:3 × flag 融合蛋白。①土培材料的诱导处理。取转基因拟南芥 3 个株系的 T3 代纯系种子为材料,土培生长 1 个月,用 50 μmol/L 雌激素喷洒叶片进行诱导。取 16 h 处理的拟南芥叶片 3~4 片放入加了小钢珠的 1.5 ml 离心管中,液氮中迅速冷冻,于 -70 °C 储存备用,进行后续的 western-blot 检测,每个试验做 3 次生物学重复。②水培材料的诱导处理。取转基因拟南芥 3 个株系的 T3 代纯系种子为材料,Hoagland's 营养液水培生长 1 个月,用 50 μmol/L 雌激素喷洒叶片,并在培养液中加入 5 μmol/L 雌激素进行诱导处理。取 16 h 处理的拟南芥叶片 3~4 片放入加了小钢珠的 1.5 ml 离心管中,液氮中迅速冷冻,于 -70 °C 储存备用,进行后续的 western-blot 检测,每个试验进行 3 次生物学重复。③固体培养基培养材料的诱导处理。取转基因拟南芥 3 个株系的 T3 代纯系种子为材料,放入无抗 1/2MS 培养基生长 10 d 后,转移至加有 5 μmol/L 雌激素的 1/2MS 培养基继续培养诱导。取 16 h 处理的拟南芥幼苗 3~4 棵放入加了小钢珠的 1.5 ml 离心管中,液氮中迅速冷冻,于 -70 °C 储存备用,进行后续的 western-blot 检测,每个试验进行 3 次生物学重复。然后对 3 个株系进行进一步处理并于 0、8、16、24 和 32 h 分别取样进行 western-blot 检测,每个试验同样进行 3 次生物学重复。

1.2.5 *AtNF-YA10*:3 × flag 融合蛋白表达量的 Western-blot 检测。①植物总蛋白的提取。从 -70 °C 冰箱中取出冻存材料,研磨至细末状,加入 100 μl 的蛋白提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 120 mmol/L NaCl; 10% Glycerol; Triton X-100; 5 mmol/L PMSF; 10 mmol/L DTT; 1 × Protease Inhibitor Cocktail),剧烈振荡十几秒钟,冰浴十几秒钟后继续振荡,反复多次直至混匀;4 °C, 14 000 r/min,离心 15 min 后于冰上吸取上清备用。②蛋白免疫印记(Western blot)。SDS-PAGE 胶的配置及样品处理、上样及转膜等步骤参照 Handbook of Immunoblotting of Proteins^[19],待转膜结束,将 PVDF 膜取下,放入盛有丽春红溶液的培养皿中,染色 1~2 min;清水洗涤 2~3 遍,用荧光照相系统(Chemi DOC-It Imaging System, UVP)照相,选取 Rubisco 的大亚基为上样对照;然后将 PVDF 膜放于用 PBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭液中,于摇床上室温封闭处理 2 h,加入一抗(1:5 000),4 °C 振荡过夜后 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min;加入二抗(1:5 000),室温遮光 60

min, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 最后用 ODYSSEY 荧光照相系统对 PVDF 膜扫描, 获得目的蛋白的荧光条带。

1.2.6 Western blot 数值分析。以 Rubisco 大亚基蛋白丽春红染色条带作为上样对照, 用 Image J 软件对丽春红和荧光条带进行定量处理^[20], 荧光条带值除以丽春红条带值所得数值即为样品所含目的蛋白的相对表达量, 以此数值再进一步分析。

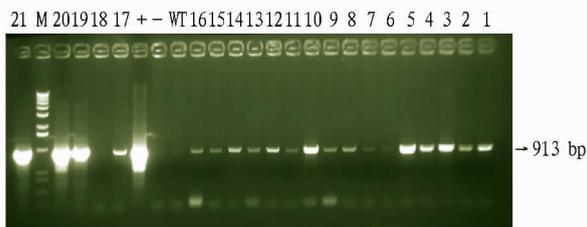
2 结果与分析

2.1 雌激素诱导表达 *AtNF-YA10:3 × flag* 拟南芥转基因植株的获得

利用农杆菌介导的方法转化拟南芥 Col-0 花蕾, 收获种子后播种于含有 25 mg/L Hygromycin 的 1/2 MS 培养基。培养 1 月左右, 挑选抗性小苗转移到蛭石基质培养, 待小苗长至 5~6 片叶时取叶提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 鉴定阳性的植株收获 T1 代种子。图 1 为转化植株的 PCR 鉴定结果, 所用引物为 YA10flagFW: 5'-CTCGAGATGCAAAGT-GAGGAGC-3' 和 PER-8R: 5'-GAAACCGATGATACGGAC-3'。共获得独立转化株系 20 个(图 1)。随机取其中 3 个继续培养获得 T3 代纯系, 以此为材料进行下一步的研究。

2.2 不同培养方式雌激素诱导外源 *AtNF-YA:3 × flag* 融合蛋白表达的分析

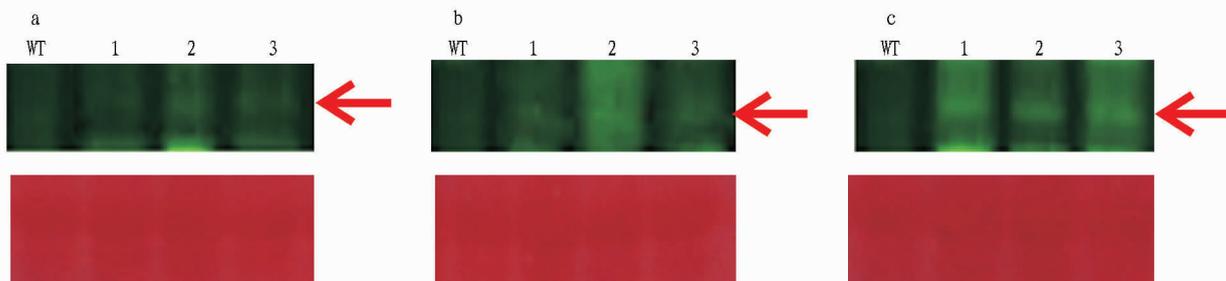
分别对 3 种培养方式培养的 3 个拟南



注: 1~21 为不同的 T0 代独立转化株系; M 为 1 kb plus DNA Ladder; WT 为拟南芥 Col-0; + 为 pER8-*AtNF-10flag* 表达载体质粒; - 为空白对照。

图 1 转基因拟南芥 PCR 检测结果

芥株系幼苗进行处理, 首先参照左等^[9]的研究结果, 取诱导处理 16 h 的叶片, 对 *AtNF-YA10:3 × flag* 融合蛋白的表达量进行 western-blot 检测。结果表明, 土培法 1 月龄拟南芥转基因苗喷叶诱导和水培法 1 月龄拟南芥转基因苗喷叶加灌根诱导处理 western-blot 检测信号均较弱, 条带不清晰且杂带多(图 2a~b), 而于 1/2MS 培养基中培养并诱导 16 h 的材料, 3 个株系均有清晰的目的条带, 且 3 个株系表达量相似(图 2c)。以上结果表明, 用 1/2MS 培养基培养的方式优于土培法和水培法。



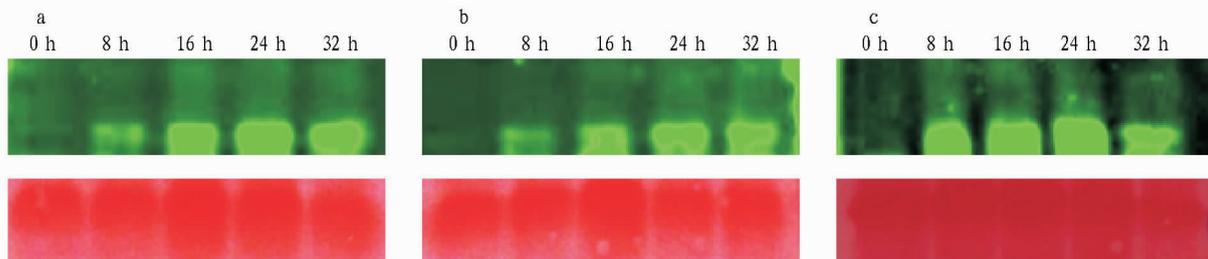
注: a 为土培法培养的幼苗经雌激素诱导 16 h 时的蛋白表达情况; b 为水培法培养的幼苗经雌激素诱导 16 h 时的蛋白表达情况; c 为培养基中培养的幼苗经雌激素诱导 16 h 时的蛋白表达情况; 1、2 和 3 表示 3 个不同的转基因株系; 图上部绿色部分条带为 *AtNF-YA10:3 × flag* 表达条带; 图下部红色条带部分为 Rubisco 蛋白丽春红染色条带。箭头位置为 *AtNF-YA10:3 × flag* 表达条带。

图 2 3 种不同培养方式的转基因株系经雌激素诱导 16 h 后融合蛋白的表达

2.3 雌激素诱导不同时间段外源 *AtNF-YA:3 × flag* 融合蛋白表达的分析

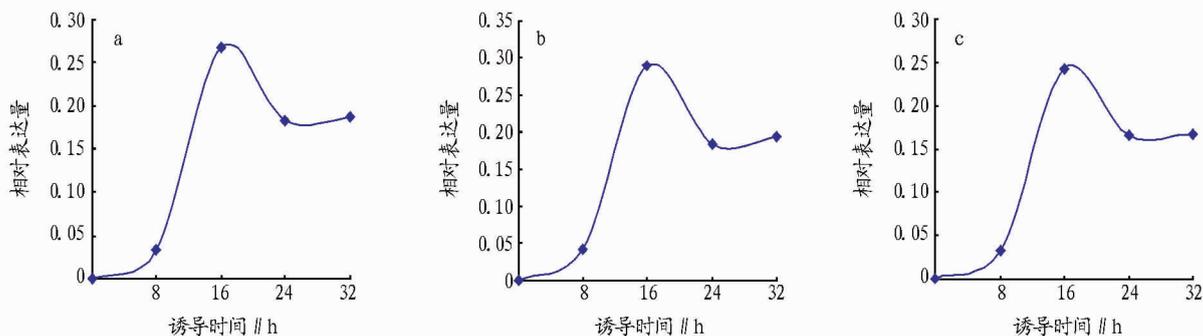
对在 1/2MS 培养基中生长的幼苗, 进一步进行不同诱导时间的摸索。在 1/2MS 培养基生长 10 d 后的拟南芥转基因苗, 在培养皿中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素诱导, 结果显示, 拟南芥转基因苗在雌激素诱导后 8、16、24 和 32 h 时

间段 *AtNF-YA10:3 × flag* 蛋白均有表达(图 3)。以 Rubisco 大亚基蛋白丽春红染色条带作为上样对照, 用 Image J 软件对丽春红和荧光条带进行定量处理, 结果显示在 0~16 h 内蛋白表达量逐渐升高, 并在 16 h 左右达到最高, 之后略有下降, 在 24~32 h 区间内保持稳定状态(图 4)。



注: 图上部绿色部分条带为 *AtNF-YA10:3 × flag* 表达条带; 图下部红色条带部分为 Rubisco 蛋白丽春红染色条带。图中 a、b、c 分别为 3 个独立转化株系的检测结果, 试验共重复 3 次。

图 3 Western-blot 检测雌激素诱导后转基因拟南芥中 *AtNF-YA10:3 × flag* 融合蛋白的表达



注:图中纵坐标表示目的蛋白与 Rubisco 大亚基蛋白条带灰度比值既相对表达量,横坐标表示诱导时间。a、b、c 分别为 3 个独立转化株系的检测结果,试验共重复 3 次。

图 4 雌激素诱导后转基因拟南芥中 AtNF-YA10:3 x flag 融合蛋白表达模式

3 结论与讨论

试验研究表明,在 1/2MS 培养基中 24 h 光照连续培养 10 d 的转基因拟南芥幼苗,经 5 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素诱导培养至 16 h,受转录激活系统 XVE 调控的 NF-YA10:3 x flag 融合蛋白表达量达到最高峰,然后略有下降后一直持续到 32 h 这个时间段都维持一个较稳定的状态。也对土培法生长一个月的转基因材料用 50 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素喷洒叶片的方式及水培法生长一个月的转基因材料用 50 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素喷洒叶片和 5 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素灌根的方式诱导后进行了试验。结果表明在培养基上生长 10 d 的幼苗对雌激素的应答最为敏感,外源基因的表达水平远远高于生长了 1 个月的拟南芥苗。因此选定 1/2MS 培养基生长 10 d 后的拟南芥转基因苗雌激素诱导 16 h 为最优的 AtNF-YA10:3 x flag 融合基因表达条件,为后续的试验工作的顺利进行提供了条件,也为利用此系统表达其他外源蛋白提供了一个参考。同时根据试验结果显示采用雌激素诱导的转录激活系统的转基因拟南芥在不同的生长时期对于雌激素的诱导响应水平存在差异。这在研究文献中鲜有报道。其中的原因还有待进一步阐明。

利用雌激素诱导的转录激活系统(XVE)诱导外源基因在拟南芥以及西红柿转基因植株中大量表达在科学研究中得到广泛的研究与应用。但由于雌激素与植物内源雌激素形成共轭雌激素后会导致雌激素对该系统的诱导失效。所以该系统不适用于如大豆等内源雌激素水平高的植物物种中。另外由于雌激素大量使用会对环境产生污染以及雌激素受光照后不稳定^[21],此系统不适合应用于要进行田间实验的植物中。所以开发表达效率更高应用范围更广泛的诱导转录激活系统也显得很有必要。

参考文献

- [1] JOAN T, ODELL, FERENC NAGY, et al. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter[J]. Nature, 1985, 313: 810 - 812.
- [2] MCELROY D, ZHANG W, CAO J, et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation[J]. The Plant Cell, 1990, 2(2): 163 - 171.
- [3] CHRISTENSEN A H, QUAIL P H. Ubiquitin promoter - based vectors for

- high - level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants[J]. Transgenic Res, 1996, 5(3): 213 - 218.
- [4] JONES H D, SPARKS C A. Promoter Sequences for Defining Transgene Expression[J]. Transgenic Wheat, Barley and Oats, 2009, 478: 171 - 184.
- [5] 路静, 赵华燕, 何奕昆, 等. 高等植物启动子及其应用研究进展[J]. 自然科学通报, 2004, 14(8): 856 - 866.
- [6] 宋扬, 周军会, 张永强. 植物组织特异性启动子研究[J]. 生物技术通报, 2007(6): 21 - 24.
- [7] CHEN R, XUE G, CHEN P, et al. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene[J]. Transgenic Res, 2008, 17(4): 633 - 643. [8] 王志新, 赵琳, 李文滨. 植物诱导型启动子的研究进展[J]. 大豆科技, 2011(3): 5 - 9.
- [9] ZUO J R, NIU Q W, CHUA N H. An estrogen receptor - based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants[J]. The Plant Journal, 2000, 24(2): 265 - 273.
- [10] BENFEY P N, REN L, CHUA N H. Tissue - specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development[J]. EMBO J Jun, 1990, 9(6): 1677 - 1684.
- [11] ZUO J, CHUA N H. Chemical - inducible systems for regulated expression of plant genes[J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(2): 146 - 151.
- [12] ZUO J, HARE P D, CHUA N H. Applications of chemical - inducible expression systems in functional genomics and biotechnology[J]. Methods Mol Biol, 2006, 323: 329 - 342.
- [13] NARDINI M, GNESUTTA N, DONATI G, et al. Sequence - Specific Transcription Factor, NF - Y Displays Histone - like DNA Binding and H2B - like Ubiquitination[J]. Cell, 2013, 152: 132 - 143.
- [14] GUSMAROLI G, TONELLI C, MANTOVANI R. Regulation of novel members of the Arabidopsis thaliana CCAAT - binding nuclear factor Y subunits[J]. Gene, 2002, 283: 41 - 48.
- [15] PETRONI K, KUMIMOTO R W, GNESUTTA N, et al. The promiscuous life of plant nuclear factor Y transcription factors[J]. The Plant Cell, 2012, 24: 4777 - 4792.
- [16] XU M Y, ZHANG L, LI W W, et al. Stress - induced early flowering is mediated by miR169 in Arabidopsis thaliana[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(1): 89 - 101.
- [17] CLOUGH S J, ANDREW F. Bent Floral dip: a simplified method for Agrobacterium - mediated transformation of Arabidopsis thaliana[J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 735 - 743.
- [18] HOAGLAND D R, ARNON D I. The water - culture method for growing plants without soil[M]. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, University of California, 1950: 347.
- [19] BJERRUN O J, HEEGAARD N H H. CRC Handbook of Immunoblotting of Proteins, Volume 1, Technical Descriptions[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988: 229 - 236.
- [20] 张成岗, 袁守军, 邓美玉, 等. 一种对斑点和条带信号进行半定量图像分析的简便方法[J]. 中国电视学与图像分析, 2001, 6(3): 167 - 170.
- [21] 李健, 位兰, 薛群群, 等. 环境雌激素的雄性生殖毒性作用及机制[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(3): 81 - 82.